

ステロイド性抗炎症薬によるMAPキナーゼ活性化抑制とサイトカイン産生抑制について

著者	平澤 典保
URL	http://hdl.handle.net/10097/41341

ステロイド性抗炎症薬によるMAP キナーゼ活性化抑制と
サイトカイン産生抑制について

(09672211)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 平澤 典保
(東北大学薬学部 助教授)

【はしがき】

この研究報告書は、文部省科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）の交付を受けて、平成9年度から平成10年度まで2年間にわたって行われた「ステロイド性抗炎症薬によるMAPキナーゼ活性化抑制とサイトカイン産生抑制について」の研究成果について、本研究を計画するに至った経緯を含めてまとめたものである。

【研究組織】

研究代表者 平澤典保（東北大学薬学部 助教授）

研究分担者 大内和雄（東北大学薬学部 教授）

【研究経費】

平成 9年度 2, 000千円

平成10年度 700千円

計 2, 700千円

【研究発表】

（1）原著論文

- (1) Hirasawa, N., Sato, Y., Fujita, Y., Mue, S. and Ohuchi, K.
Inhibition by Dexamethasone of Antigen-induced c-Jun N-terminal
Kinase Activation in Rat Basophilic Leukemia Cells
Journal of Immunology 161: 4939-4943 (1998)

（2）総説

（1）平澤典保、大内和雄

マスト細胞における MAP kinase の制御機構
アレルギー科 5: 356-362 (1998)

（2）平澤典保、大内和雄

各種ステロイド薬の抗炎症・抗アレルギー作用
アレルギー・免疫 6: 37-43 (1998)

（3）口頭発表

- (1) 平澤典保、藤田優子、佐藤由佳子、無江季次、大内和雄
第71回日本薬理学会年会（1998年3月）

- (2) 平澤典保、佐藤由佳子、大内和雄
第71回日本生化学会大会（1998年10月）

- (3) 平澤典保、大内和雄、影近弘之、首藤紘一
日本薬学会第119年会（1999年3月、発表予定）

- (4) 平澤典保、大内和雄
第20回日本炎症学会（1999年7月、発表予定）

1. 研究の背景

ステロイド性抗炎症薬は、種々の炎症性疾患において強力な抗炎症作用を発揮するが、重篤な副作用を発現することもある。そのためステロイド性抗炎症薬の抗炎症作用機序の解明は薬学におけるひとつの重要課題であった。ステロイド性抗炎症薬はグルココルチコイド受容体 (GR) に結合し、ある種の機能蛋白質の誘導作用あるいは誘導抑制作用を示す。その機序として、ステロイド性抗炎症薬と GR の複合体が DNA の glucocorticoid responsive element (GRE) に結合して抗炎症性蛋白質を誘導すること、また、negative GRE に結合して、あるいは種々の転写因子と結合してその作用を抑制することにより、炎症反応の誘発や進展に関与する機能蛋白質の発現を抑制することが示唆されている。このような機能蛋白質として、種々のサイトカイン、ケモカイン、接着分子、シクロオキシゲナーゼ-2、ホスホリパーゼ A₂ や誘導型 NO 合成酵素などがあり、これらの機能蛋白質の誘導抑制がステロイド性抗炎症薬の抗炎症作用の中心的機序であると考えられている (1)。

一方、筆者らは、ステロイド性抗炎症薬は酵素誘導を介さない反応、すなわち刺激直後のアラキドン酸遊離も抑制することに注目し、その機序について解析したところ、細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の活性化に大きく関与している p42/44 MAP kinase (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) の活性化を抑制することを明らかにした (2)。一方、ステロイド性抗炎症薬と GR の複合体が相互作用しその DNA 結合を抑制する転写因子として AP-1 が報告されている (3-5) が、AP-1 の DNA 結合抑制作用だけではステロイド性抗炎症薬のサイトカイン産生抑制機序を説明できないことも指摘されている。そこで本研究は、MAP キナーゼファミリー すなわち ERK、p38 MAP kinase (p38 MAPK)、および c-Jun N-terminal kinase (JNK) が種々の転写因子の活性化にも関与していることに注目し、ステロイド性抗炎症薬のサイトカイン抑制機序として、MAP キナーゼの活性化抑制作用があるかどうか解析した。また、MAP キナーゼの活性化を抑制する薬物が真にサイトカインの産生を抑制するかどうかについて解析し、ステロイド性抗炎症薬の作用と比較した。最後にステロイド性抗炎症薬の ERK 活性化抑制作用の分子機序の解明を試みた。

2. 実験方法

2-1 材料

ラット肥満細胞株 RBL-2H3 は Dr. Michael A. Beaven (NIH, U.S.A.) から、また、Am80, Re80, HX600 および LE540 は首藤教授 (東京大学大学院薬学研究科) から供与された。Dexamethasone (Sigma Chemical Co., U.S.A.), wortmannin および LY294002 (Biomol Research Laboratory, U.S.A.), PD98059 (New England Biolabs, U.S.A.), SB203580 (Calbiochem-Novabiochem Co., U.S.A.), Anti-c-Jun, anti-JNK, anti-p38, および anti-MEKK1 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.), anti-phospho-p38, anti-phospho-ATF-2 および anti-phospho-c-Jun (New England Biolabs, U.S.A.), GST-c-Jun (Stratagene, U.S.A.), GST-MEK-1 (Upstate Biotechnology Inc., U.S.A.), Gluthathione-Sepharose (Pharmacia Biotech, Sweden), ^{32}P -ATP (DuPont/NEN, U.S.A.) および IL-4 ELISA kit (BioSource International, U.S.A.) はそれぞれ購入した。

2-2 RBL-2H3細胞の培養と刺激

RBL-2H3細胞 5×10^5 cells を 12 well-cluster dish の各 well に加え、10% FBS 及び IgE (DNP 特異的 IgE 産生ハイブリドーマ培養上清) $5 \mu\text{l}/\text{ml}$ 存在下で一晩培養した。PIPES 緩衝液 (25 mM PIPES, pH 7.2, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1% (w/v) BSA) で2回洗浄後、抗原 DNP-HSA 50 ng/ml を含む PIPES 緩衝液中で一定時間培養した。

2-3 キナーゼ活性の測定

JNK 活性の測定は Chen らの方法 (6) に従って、GST-c-Jun-conjugated Sepharose を用いた pull-down 法で測定した。また、MEKK-1 活性は、MEKK-1 を免疫沈降し、GST-MEK-1 を基質としてキナーゼアッセイを行った。SDS-PAGEで分画し、GST-c-Jun および GST-MEK-1 のリン酸化を autoradiography で検出した。

2-4 イムノブロット

一定時間刺激した後、培養液上清を除き、氷冷した PBS で3回洗浄したのち、lysis buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 25 mM NaCl, 0.1 mM Na_3VO_4 , 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin) 75 μL を各 well に加えて細胞を回収した。18,600 x g で20分間遠心後、遠心上清をとり、SDS-PAGE により cell lysate 中の蛋白質を分画した。ニトロセルロース膜にセミドライブロットティング法により蛋白質をトランスファーし、各種抗体を用いてイムノブロットを行った。

核内転写因子 c-Jun および ATF-2 をイムノブロットする場合には、lysis buffer 60 μl を加えて細胞を回収し、さらに 3x sample buffer を 30 μl 加えて核内蛋白質を含む cell lysate を調製した。

2-5 IL-4 の測定

RBL-2H3 細胞 (5×10^5 cells) を上述のように IgE で感作したのち、5% (v/v) FBS を含む E'MEM で3回洗浄後、5% (v/v) FBS および抗原 DNP-HSA (最終濃度 50 ng/ml) を含む E'MEM を200 μl 加え、4時間培養した。培養液上清を回収して、遠心 (220 x g, 5 min, 4°C) し、その遠心上清 0.1 ml を IL-4 ELISA キット (sensitivity <15 pg/ml) の測定用ウェルに加え、IL-4 量をプロトコールに従って測定した。

2-6 RT-PCR による mRNA の測定

RBL-2H3 細胞 (2×10^6 cells) を上述のように抗原で刺激し、2時間後に mRNA を acid guanidinium-phenol-chloroform 法により抽出し、逆転写したのち、PCR のテンプレートとした。IL-4 については、プライマーとして、(former) 5'-ACCTTGCTGTCACCCTGTTCTTGC-3' および (reverse) 5'-GTTGTGAGCGTGGACTCATTC-3' を用い、94°C 1分間、58°C 1分間、および 72°C 2分間を 25 サイクルの PCR を行った。また、内部標準としてラットの glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) 遺伝子についても同様に RT-PCR を行った (7)。

2-7 細胞膜画分の調製

RBL-2H3細胞 (2×10^6 cells) を抗原で 1 分間刺激した後、氷冷した PBS で 3 回洗浄し、200 μ l のホモジナイズ用緩衝液 (10 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 2.5 mM *p*-nitrophenylphosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 10 μ g/ml leupeptin) を加えて細胞を回収した。回収した細胞浮遊液は氷上に 10 分間放置した後、Dounce homogenizer でホモジナイズした (100 strokes)。600 x g で 5 分間して未破碎細胞を除いた後、105,000 x g で 30 分間遠心して、細胞膜画分を分離した。

2-8 薬物処理

Dexamethasone は、エタノールに溶解し、E'MEM で希釈し、刺激一定時間前に培養液に添加した。Wortmannin、LY294002、SB203580 および PD98059 は DMSO に溶解し、PIPES 緩衝液で希釈し、刺激一定時間前に添加した。各種レチノイドはエタノールに溶解し、抗原を含む E'MEM に添加した。それぞれ対照群には、エタノールあるいは DMSO を同量加え、最終濃度をいずれも 0.1% (v/v) とした。

2-9 統計処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差値で表し、棄却検定は Thompson's F-test により、有意差検定は Student's unpaired *t*-test により解析した。

3. 研究成果

3-1 ステロイド性抗炎症薬の JNK の活性化抑制作用

3-1-1 抗原刺激による JNK の活性化と c-Jun のリン酸化

IgE で感作した RBL-2H3 細胞を抗原で刺激し、経時的に JNK 活性および細胞内 c-Jun のリン酸化を解析した。Fig. 1 に示すように、JNK 活性は抗原刺激後数分以内に増加し始め、40 分で最大となった。また、細胞内 c-Jun のリン酸化を phospho-c-Jun 抗体を用いて解析したところ、c-Jun のリン酸化も JNK の活性化に伴い経時的に増加した。

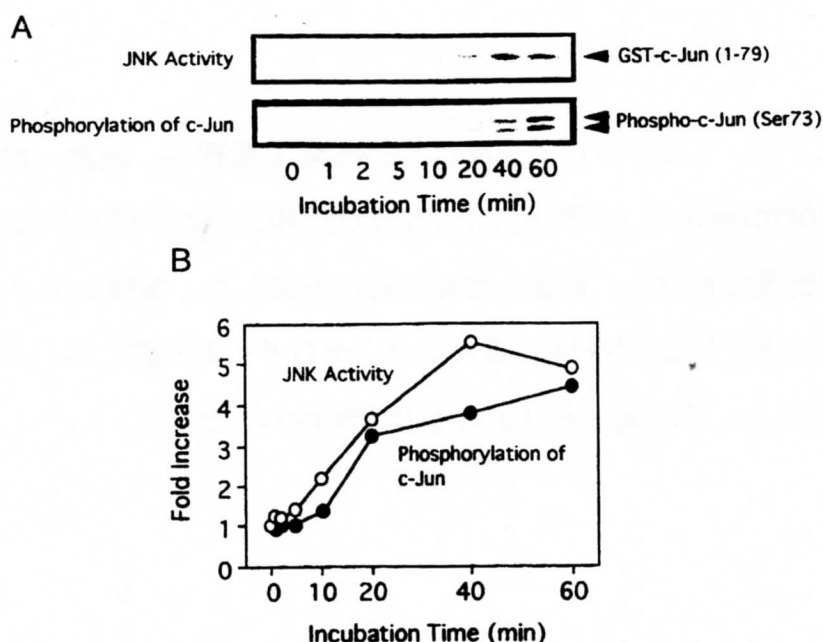


Figure 1. Time course of the antigen-induced JNK activation and c-Jun phosphorylation.

(A) IgE-sensitized cells were stimulated by the antigen DNP-HSA (50 ng/ml) for the indicated period of time. The cell lysates were prepared and JNK was pulled down with GST-c-Jun₁₋₇₉. Determination of JNK activity was carried out as described in "Materials and Methods". In a corresponding set of cultures, the phosphorylated c-Jun at Ser 73 in the cell lysate was detected by immunoblotting. (B) The fold-increase in JNK activity and the content of phosphorylated c-Jun in the cells were determined by densitometric analysis. The results were confirmed by the two independent experiments.

3-1-2 JNK の活性化と c-Jun のリン酸化に対する dexamethasone の効果

RBL-2H3 細胞をステロイド性抗炎症薬 dexamethasone (1, 10 および 100 nM) であらかじめ 18 時間処理した後、抗原で刺激すると、抗原刺激 40 分後の JNK 活性の上昇は濃度依存的に抑制された (Fig. 2A)。このとき、JNK の蛋白質量の部分的に低下が認められた。また、抗原刺激による細胞内の c-Jun のリン酸化の増大も dexamethasone の濃度に依存して抑制され、JNK 活性の低下とよく一致した (Figs. 2B and 2C)。また、dexamethasone の JNK 活性化の抑制作用の発現にどの程度の前処理時間を必要とするかについて解析した。その結果、dexamethasone を抗原と同時に、あるいは 3 時間前に添加した場合には抑制作用が認められなかったが、6 時間以上の前処理により、前処理時間に依存して抑制作用を発現した (Fig. 3)。

3-1-3 JNKキナーゼキナーゼ MEKK-1 の活性化に対する dexamethasone の効果

Dexamethasone の JNK 活性化抑制機構を明らかにするために、JNK キナーゼキナーゼである MEKK-1 の活性化に対する効果を検討した。抗原刺激後、MEKK-1 を免疫沈降し、そのキナーゼ活性を GST-MEK-1 を用いて解析したところ、dexamethasone は抗原刺激による MEKK-1 の活性増大を濃度依存的に抑制した (Fig. 4)。

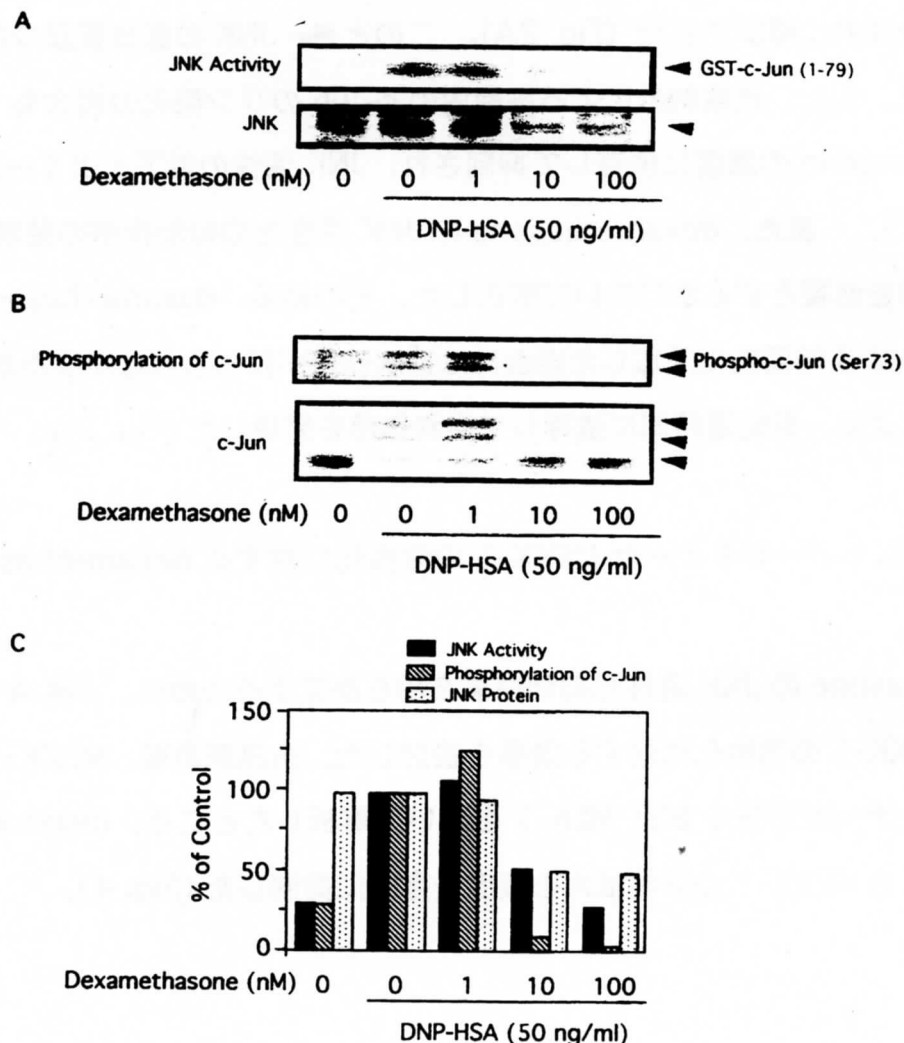


Figure 2. Effects of various concentrations of dexamethasone on the antigen-induced JNK activation and c-Jun phosphorylation.

RBL-2H3 cells were incubated at 37°C for 18 h in the presence of IgE and the indicated concentrations of dexamethasone. The cells were then stimulated by the antigen DNP-HSA (50 ng/ml) for 40 min. (A) JNK activity was determined as described in the legend to Fig. 1. The content of JNK protein was determined by immunoblotting. (B) The levels of phosphorylated c-Jun at Ser 73 and c-Jun were determined by immunoblotting. (C) JNK activity and the content of the phosphorylated c-Jun and JNK protein were determined by densitometric analysis. The results were confirmed by the two independent experiments.

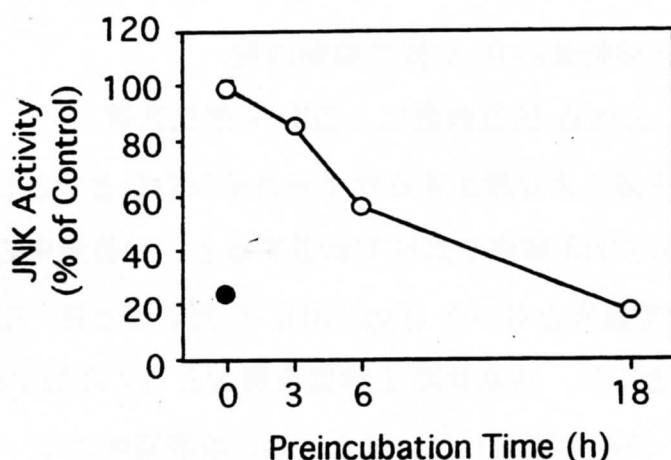


Figure 3. Time course of the inhibition of JNK activation by dexamethasone.

RBL-2H3 cells were incubated at 37°C for 18 h in medium containing IgE. Dexamethasone was added to the medium 0, 12, or 15 h after the beginning of the incubation at a final concentration of 100 nM. The cells were then washed twice and stimulated by the antigen DNP-HSA (50 ng/ml) for 40 min in the absence of dexamethasone. JNK activity was determined as described in the legend to Fig. 1. The density of JNK activity in the antigen-stimulated cells without pretreatment with dexamethasone is set to 100 %. A closed circle represents the level of JNK activity in the non-stimulated cells. The results were confirmed by the two independent experiments.

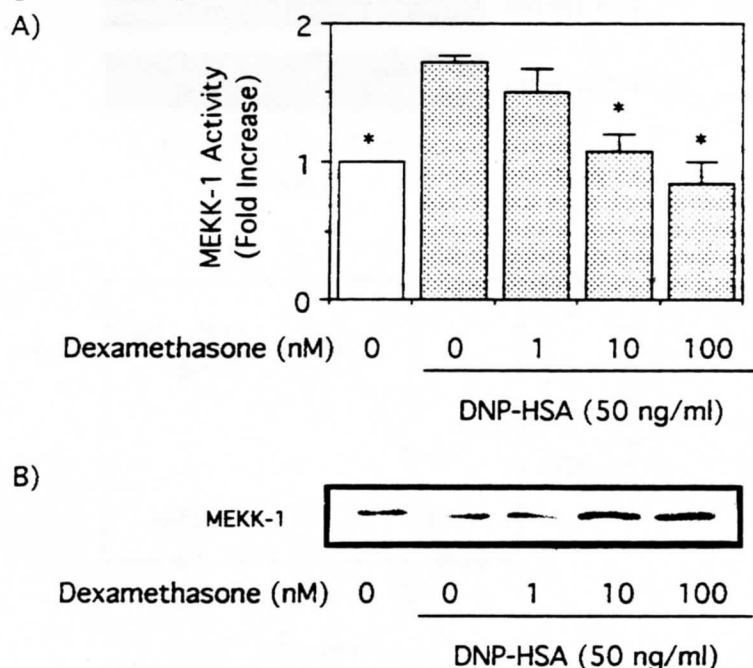


Figure 4. Effects of dexamethasone on the activation of MEKK-1.

RBL-2H3 cells were incubated at 37°C for 18 h in the presence of IgE and the indicated concentrations of dexamethasone. The cells were then stimulated by the antigen with DNP-HSA (50 ng/ml) in the absence of dexamethasone. (A) MEKK-1 activity 20 min after the antigen stimulation was determined as described in "Materials and Methods". The fold-increase in MEKK-1 activity was determined by densitometric analysis. The vertical bars represent S.E.M. of 3 experiments. Statistical significance: * $P < 0.01$ vs. the antigen control. (B) The content of MEKK-1 protein 20 min after the antigen stimulation was determined by immunoblotting. The results were confirmed by the three independent experiments.

3-2 MAP kinase 活性化抑制薬の IL-4 産生抑制作用

3-2-1 RBL-2H3 細胞における 抗原刺激による IL-4 産生亢進

RBL-2H3 細胞が抗原刺激により産生するサイトカインのひとつとして、IL-4 に注目した。IgE で感作した RBL-2H3 細胞を抗原で刺激すると、培養液中の IL-4 量は 1 時間後から増加し、4 時間で最大となった (Fig. 5B)。またこのとき、IL-4 mRNA レベルを RT-PCR 法で解析したところ、抗原刺激 2 時間を最大として増加することが明らかになった (Fig. 5A)。なお、抗原で刺激しない場合には、培養液中に IL-4 はほとんど検出されなかった。

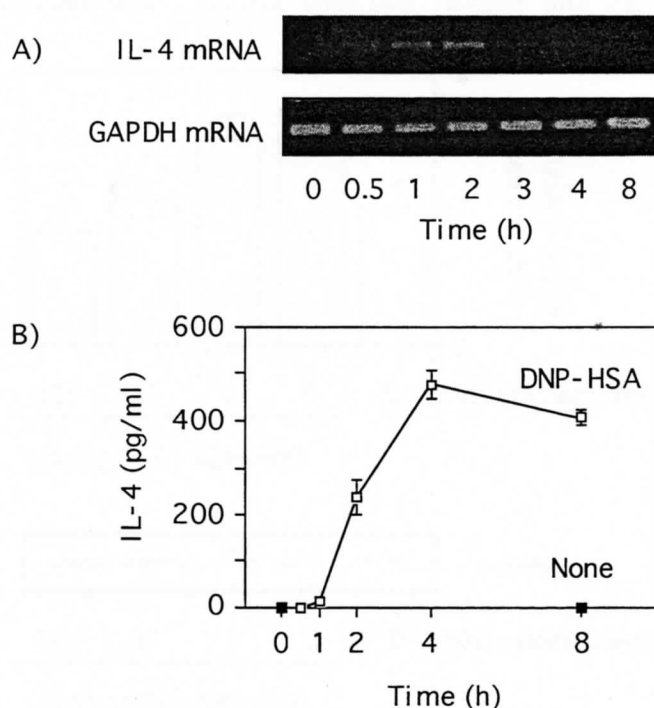


Figure 5. Time course of IL-4 mRNA levels and IL-4 production in the antigen-stimulated RBL-2H3 cells.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (1×10^6 cells (A) or 2×10^5 cells (B)) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for the periods indicated. (A) Total RNA was extracted and the levels of mRNA for IL-4 and GAPDH were detected by RT-PCR as described in "Materials and Methods". (B) The concentrations of IL-4 in the conditioned medium were determined by ELISA. Closed squares indicate IL-4 concentrations in the conditioned medium of unstimulated cells. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. The results were confirmed by two additional independent experiments.

3-2-2 Phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬 wortmannin の MAP kinase 活性化に対する作用

AP-1 など種々の転写因子を活性化する MAP kinase の活性化に対する phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬 wortmannin の効果について解析した。抗原刺激により ERK、p38 MAPK および JNK は、それぞれ、2 分 (Fig. 6A)、20 分 (Fig. 7A) および 40 分 (Fig. 1) を最大として活性化する。Wortmannin で10分間前処理した後、抗原で刺激すると、ERK の活性化はほとんど抑制されなかった (Fig. 6B) が、p38 MAPK のリン酸化および活性化 (Figs. 7B および 7C)、および JNK の活性化 (Fig. 8) は濃度依存的に抑制された。

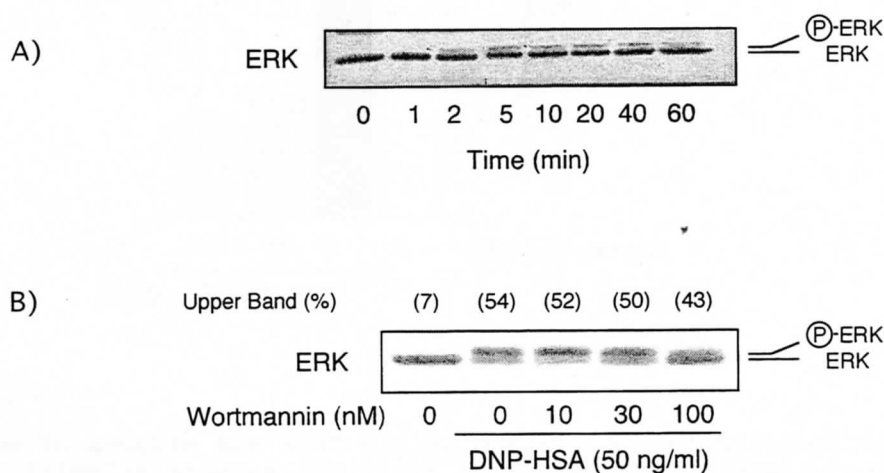


Figure 6. Antigen-induced activation of ERK and effects of wortmannin.

(A) IgE-sensitized RBL-2H3 cells (5×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for the periods indicated. (B) The cells were preincubated for 10 min in the presence of the indicated concentrations of wortmannin, then stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for 2 min in the continued presence of wortmannin. Proteins in the cell lysate were separated by electrophoresis on an 8% SDS-PAGE gel and ERK was immunoblotted. Phosphorylated ERK (P-ERK) and unphosphorylated ERK (ERK) are indicated. The numbers in parentheses in panel B indicate the proportion of the phosphorylated ERK as determined by densitometric analysis. The results were confirmed by two additional independent experiments.

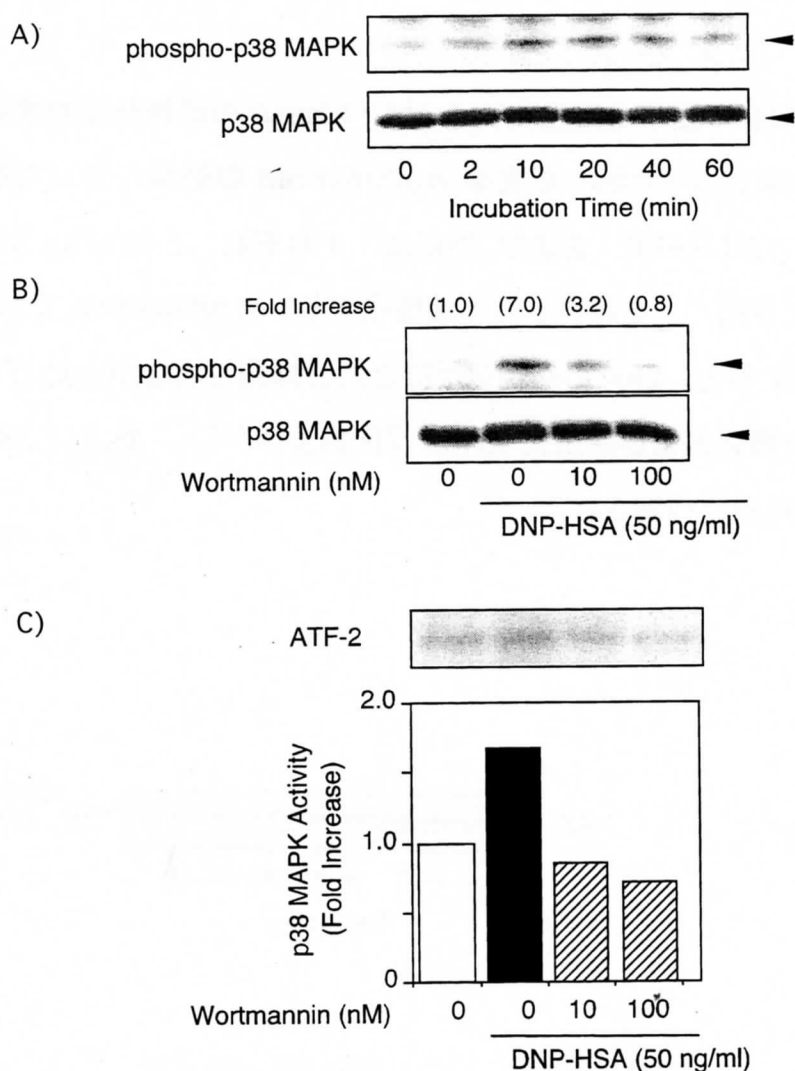


Figure 7. Antigen-induced activation of p38 MAPK and effects of wortmannin. (A) IgE-sensitized RBL-2H3 cells (5×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for the periods indicated. (B) IgE-sensitized RBL-2H3 cells (5×10^5 cells) were preincubated for 10 min in the presence of the indicated concentrations of wortmannin, then stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for 20 min in the continued presence of wortmannin. Proteins in the cell lysate were separated by electrophoresis on an 8% SDS-PAGE gel and p38 MAPK and phospho-p38 MAPK were immunoblotted. The numbers in parentheses in panel B indicate the increase in phospho-p38 MAPK as determined by densitometric analysis. The value of the unstimulated control is set to 1.0. (C) IgE-sensitized RBL-2H3 cells (1×10^6 cells) were treated as described in (B), and the p38 MAPK activity in the cell lysate was determined as described in "Materials and Methods". The phosphorylation of ATF-2 was analyzed by autoradiography and a Bioimage analyzer. The value of the unstimulated control is set to 1.0. The results were confirmed by two additional independent experiments.

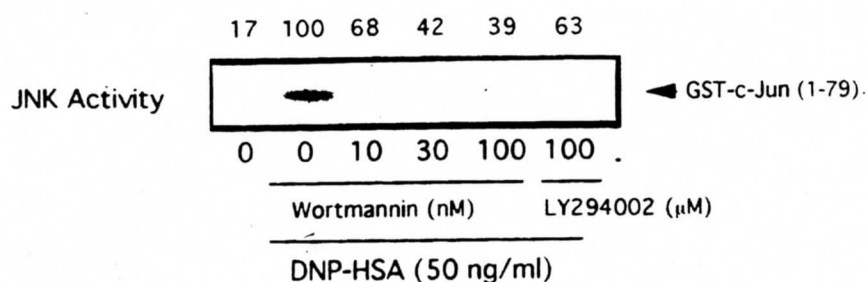


Figure 8. Effects of PI3-kinase inhibitors on the antigen-induced JNK activation.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were preincubated at 37°C in the presence or absence of the indicated concentrations of wortmannin for 10 min, or LY294002 for 30 min. The cells were then stimulated by the antigen DNP-HSA (50 ng/ml) for 40 min in the presence or absence of the inhibitors. JNK activity was determined as described in the legend to Fig. 1. The values at the top of each lane indicate relative JNK activity. The JNK activity of the cells stimulated by the antigen without the inhibitor was expressed as 100. The results were confirmed by the two independent experiments.

3-2-3 Wortmannin および LY294002 の IL-4 産生抑制作用

Wortmannin で10 分間前処理した後、wortmannin 存在下で抗原で刺激し、4 時間後の培養液上清中および細胞内の IL-4 量を測定した。Wortmannin は、培養液上清中、および細胞内の IL-4 をともに濃度依存的に低下させた (Figs. 9A および 9B)。このとき抗原刺激 2 時間後の IL-4 mRNA レベルの上昇も、同様に抑制された (Fig. 9C)。また、他の PI3-kinase 阻害薬である LY294002 も wortmannin と同様に IL-4 の産生および IL-4 mRNA の増大を濃度依存的に抑制した (Fig. 10)。

3-2-4 MEK-1 阻害薬 PD98059、および p38 MAPK 阻害薬 SB203580 の IL-4 産生抑制作用

MAP キナーゼの活性化抑制が、IL-4 の産生抑制につながるかどうか明らかにするために、ERK の活性化を抑制する PD98059 および p38 MAPK の阻害薬 SB203580 の効果について検討した。PD98059 は ERK の活性化を抑制する濃度 (Fig 11A) で IL-4 産生をむしろ増加させた (Fig. 11B)。一方、SB203580 は p38 MAPK の活性を抑制する濃度 (Fig. 12A) で、IL-4 産生を濃度依存的に抑制した (Fig. 12B)。このとき、IL-4 mRNA 量も同様に低下した (Fig. 12C)。

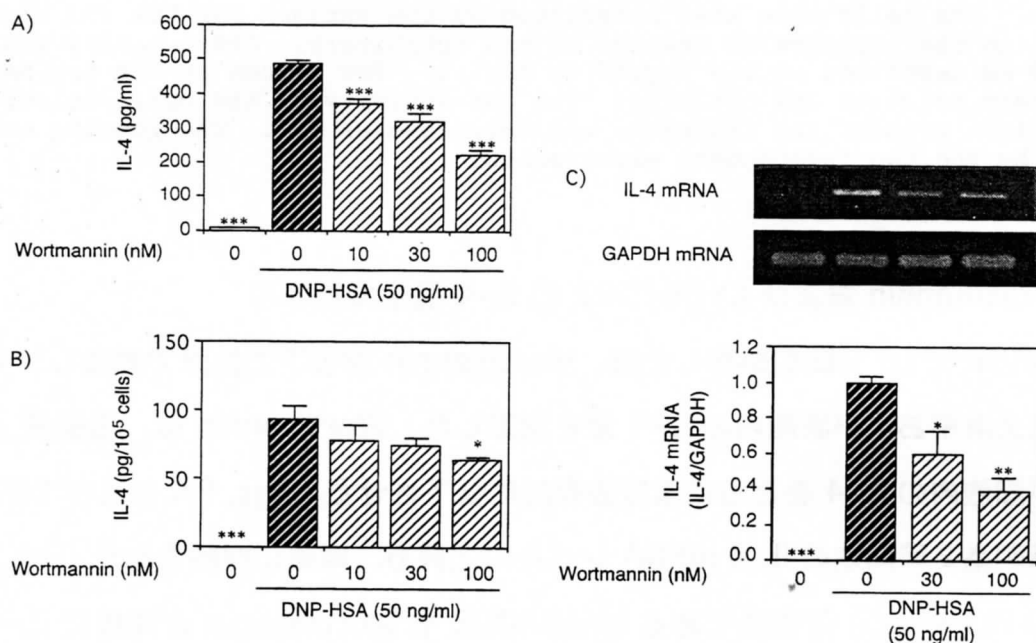


Figure 9. Effects of wortmannin on the antigen-induced IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells (A) and (B) or 1×10^6 cells (C)) were treated for 10 min in the presence of the indicated concentrations of wortmannin, then stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the continued presence of wortmannin. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium (A) and in the cells (B) at 4 h were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells.

Two hours after the antigen stimulation, total RNA was extracted and the levels of mRNA for IL-4 and GAPDH were detected by RT-PCR as described in "Materials and Methods" (C). The ratio of IL-4 mRNA density to GAPDH mRNA density was determined in three independent experiments and indicated in the lower panel. The density ratio of the antigen-stimulated control is set to 1.0. Statistical significance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control.

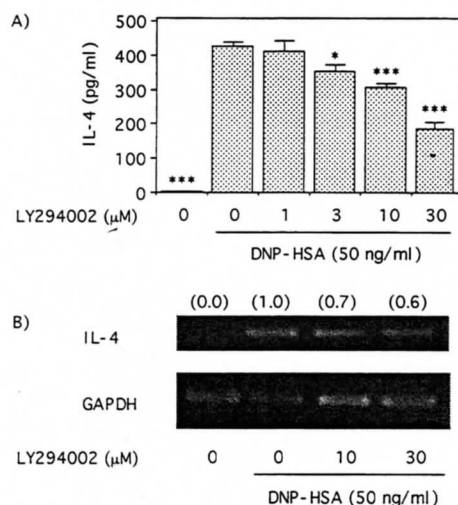


Figure 10. Effects of LY294002 on the antigen-induced IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells (A) or 1×10^6 cells (B)) were treated for 10 min in the presence of the indicated concentrations of LY294002, then stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the continued presence of LY294002. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h were determined by ELISA (A). Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. Statistical significance; *P<0.05 and ***P<0.001 vs. the antigen-stimulated control.

Two hours after the antigen stimulation, total RNA was extracted and the levels of mRNA for IL-4 and GAPDH were detected by RT-PCR as described in "Materials and Methods" (B). The numbers in parentheses in panel B indicate the ratio of IL-4 mRNA density to GAPDH mRNA density. The density ratio of the antigen-stimulated control is set to 1.0.

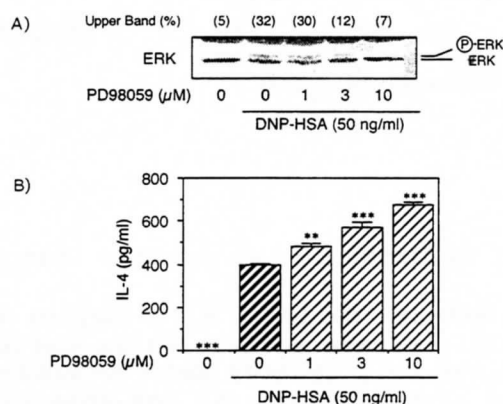


Figure 11. Effects of PD98059 on the antigen-induced ERK activation and IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (5×10^5 cells (A) or 2×10^5 cells (B)) were preincubated for 10 min in the presence of PD98059 at the indicated concentrations, then stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for 2 min (A) or 4 h (B) in the continued presence of PD98059. (A) ERK activation was determined as described in the legend to Fig. 3. The numbers in parentheses indicate the proportion of the phosphorylated ERK (P-ERK) as determined by densitometric analysis. (B) The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h was determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. The results were confirmed by two additional independent experiments. Statistical significance; **P<0.01 and ***P<0.001 vs. the antigen-stimulated control.

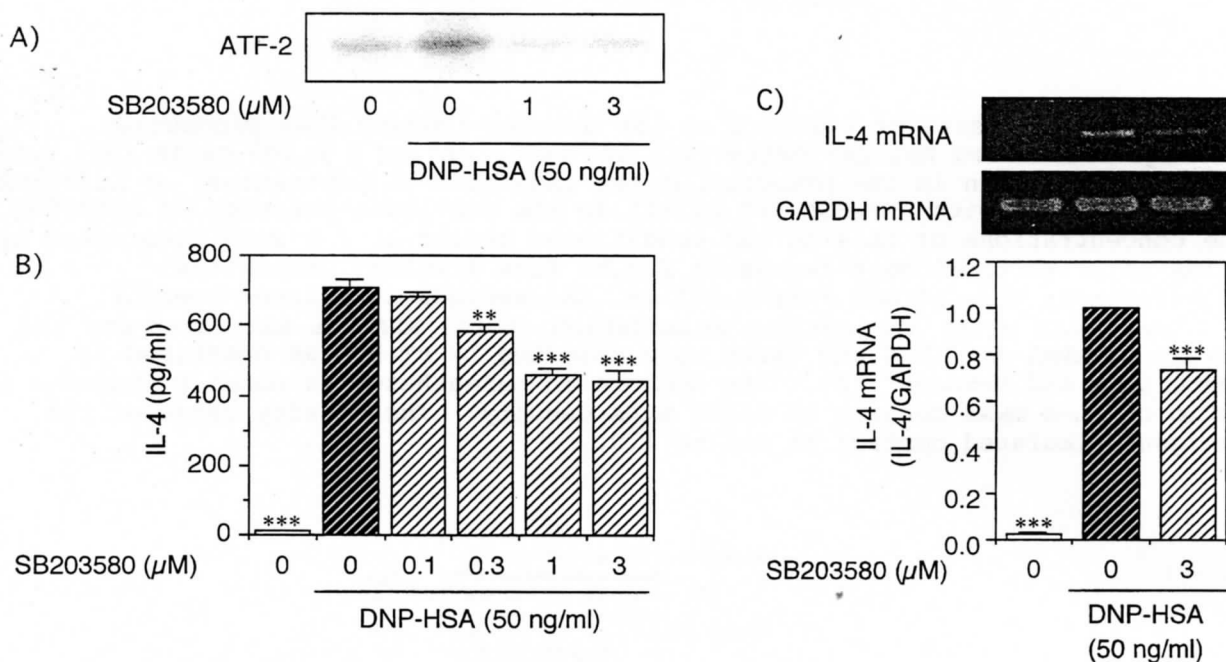


Figure 12. Effects of SB203580 on the antigen-induced activation of p38 MAPK and IL-4 production.

(A) IgE-sensitized RBL-2H3 cells (1×10^6 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) for 20 min. Kinase activities in the anti-p38 MAPK immunoprecipitates from the cell lysates were determined in the presence of the indicated concentrations of SB203580. (B) IgE-sensitized cells (2×10^5 cells) were preincubated for 10 min in the presence of the indicated concentrations of SB203580, then stimulated for 4 h with DNP-HSA (50 ng/ml) in the continued presence of SB203580. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. The results were confirmed by two additional independent experiments. (C) Two hours after the addition of the antigen, total RNA was extracted and levels of mRNA for IL-4 and GAPDH were detected by RT-PCR as described in "Materials and Methods". The ratio of IL-4 mRNA density to GAPDH mRNA density was determined in three independent experiments, and the results are indicated in the lower panel in C. The density ratio of the stimulated control is set to 1.0. Statistical significance; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control. The results were confirmed by two additional independent experiments.

3-3 レチノイドの IL-4 産生抑制作用

3-3-1 Retinoic acid receptor (RAR) 選択的 レチノイド Re80 および Am80 の IL-4 産生抑制作用

レチノイドは RAR に結合し、抗 AP-1 作用を発現する。そこで、RAR 選択的な合成レチノイド Re80 および Am80 を用いて、AP-1 の活性を抑制したときに抗原刺激による IL-4 産生がどの程度抑制されるかについて解析した。その結果、Re80 あるいは Am80 を抗原と同時に添加すると、抗原刺激後 4 時間後の培養液上清中の IL-4 量は濃度依存的に抑制された (Fig. 13)。このとき、抗原刺激 2 時間後の IL-4 mRNA レベルも低下していた (Fig. 14)。

3-3-2 RAR 拮抗薬 LE540 の作用

Re80 および Am80 の作用が RAR を介していることを確認するために、RAR 拮抗薬 LE540 をこれらのレチノイドと併用した。LE540 は Re80 100nM あるいは Am80 100 nM による IL-4 産生抑制作用を濃度依存的に抑制した (Fig. 15)。

3-3-3 Retinoic acid X receptor 選択的レチノイドの作用

RAR を介する反応は、RXRを刺激することにより増強される。そこで、RXR 選択的レチノイドである HX600 との協同作用を検討した。その結果、10 nM の Re80 あるいは Am80 による IL-4 産生抑制作用は HX600 により有意に増大した (Fig. 16)。

3-3-4 免疫抑制薬 cyclosporin A の作用

Cyclosporin A は calcineurin を阻害して、転写因子 NF-AT の活性化を抑制する。そこで、抗原刺激による IL-4 産生における NF-AT の関与を明らかにするために、cyclosporin A 存在下で抗原刺激したところ、IL-4 産生は濃度依存的に強く抑制された (Fig. 17)。

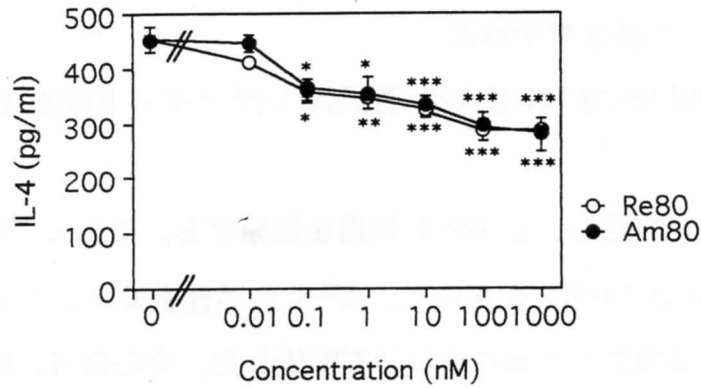


Figure 13. Effects of Re80 and Am80 on the antigen-induced IL-4 production by RBL-2H3 cells.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the presence or absence of Re80 or Am80. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. Statistical significance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control. The results were confirmed by two additional independent experiments.

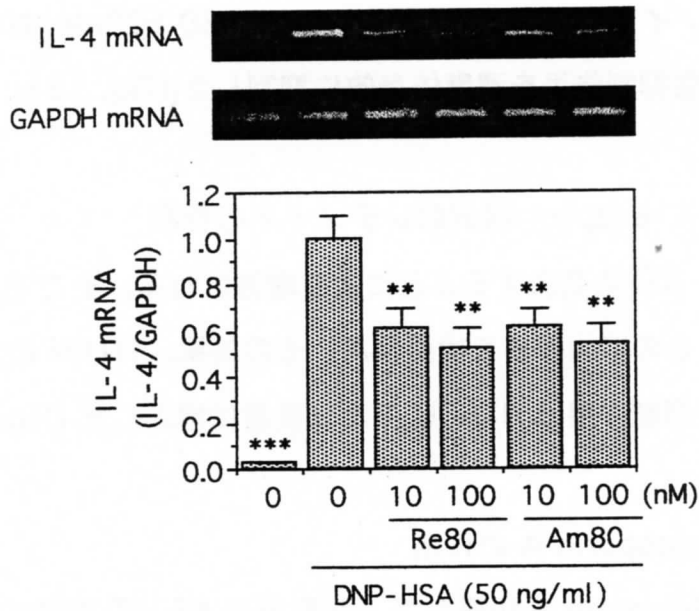


Figure 14. Effects of Re80 and Am80 on the antigen-induced increase in IL-4 mRNA.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^6 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the presence or absence of Re80 or Am80. Two hours after the antigen stimulation, total RNA was extracted and the levels of mRNA for IL-4 and GAPDH were detected by RT-PCR as described in "Materials and Methods". The ratio of IL-4 mRNA density to GAPDH mRNA density was determined in three independent experiments and indicated in the lower panel. The density ratio of the antigen-stimulated control is set to 1.0. Statistical significance; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control.

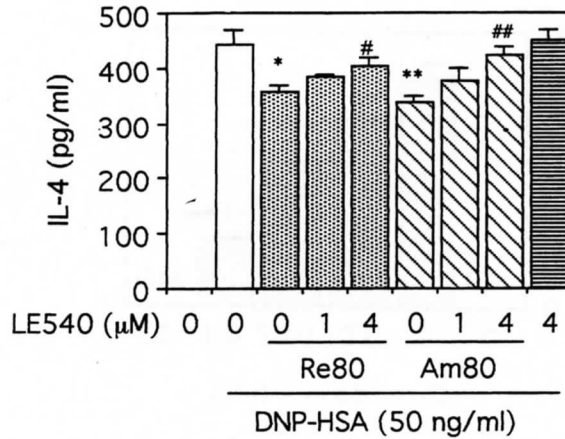


Figure 15. Effects of combination of the RAR antagonist LE540 with Re80 and Am80 on the antigen-induced IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the presence of Re80 or Am80 with or without LE540. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. Statistical significance; *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control, # $P < 0.05$ vs. Re80 or Am80 alone. N.D. indicates "not detected". The results were confirmed by two additional independent experiments.

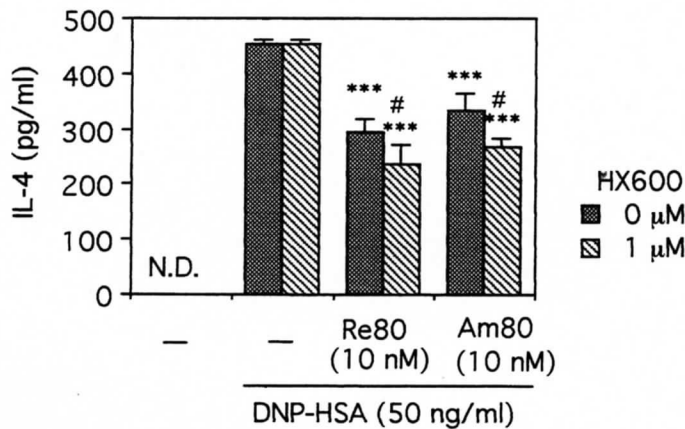


Figure 16. Effects of combination of the RXR agonist HX600 with Re80 and Am80 on the antigen-induced IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the presence of Re80 or Am80 with or without HX600. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. Statistical significance; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. the antigen-stimulated control, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs. Re80 or Am80 alone. N.D. indicates "not detected". The results were confirmed by two additional independent experiments.

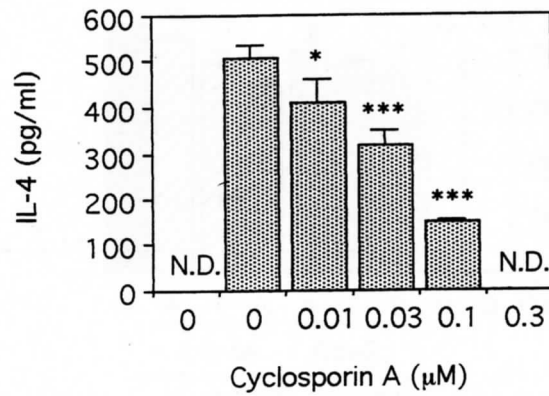


Figure 17. Effects of cyclosporin A on the antigen-induced IL-4 production.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were stimulated with DNP-HSA (50 ng/ml) in the presence or absence of cyclosporin A. The concentrations of IL-4 in the conditioned medium at 4 h were determined by ELISA. Vertical bars represent S.E.M. from 4 wells. Statistical significance; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. the antigen-stimulated control. N.D. indicates "not detected". The results were confirmed by two additional independent experiments.

3-4 ステロイド性抗炎症薬の MAP kinase 活性化抑制作用機序

3-4-1 MAPキナーゼキナーゼキナーゼ Raf-1 の細胞膜移行に対する dexamethasone の効果

Dexamethasone は ERK の活性化を抑制し、特に ERK キナーゼキナーゼである Raf-1 のリン酸化を抑制することが明らかにしている。Raf-1 は抗原刺激により低分子量 G 蛋白質 Ras が活性化されると細胞膜に移行し、リン酸化されて活性化することが知られている。そこで、dexamethasone は、Raf-1 の膜移行を抑制しているのか、リン酸化を抑制しているのかを明らかにするために、dexamethasone の Raf-1 の膜移行に対する作用について解析した。抗原で刺激した後、細胞膜画分と細胞質画分に分画し、それぞれの Raf-1 量をウエスタンブロットにより解析したところ、dexamethasone は Raf-1 の膜移行に対しては抑制作用を示さなかった (Fig. 18)。

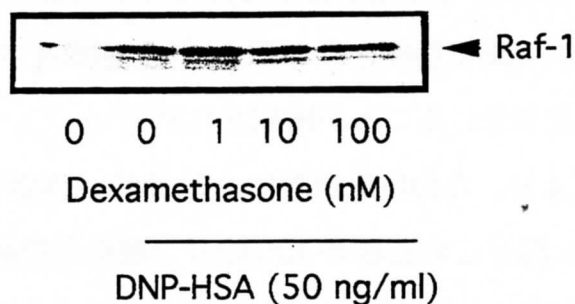


Figure 18. Effects of dexamethasone on the translocation of Raf-1.

RBL-2H3 cells were incubated at 37°C for 18 h in the presence of IgE and the indicated concentrations of dexamethasone. The cells were then stimulated by the antigen DNP-HSA (50 ng/ml) for 1 min. The membrane fraction was prepared as described in "Materials and Methods". Raf-1 in the fraction was immunoblotted.

4. 考察

本研究により、ステロイド性抗炎症薬は MAP キナーゼの活性化を抑制し、特に AP-1 の活性化を抑制すること、そしてこの AP-1 活性化抑制作用がサイトカイン産生抑制作用のひとつの機序であることを明らかにした。

4-1 ステロイド性抗炎症薬の JNK の活性化抑制作用

ステロイド性抗炎症薬は極めて強い抗炎症作用を発現するが、その主な作用機序としてサイトカインなどの炎症性蛋白質の合成の抑制が明らかにされている。その分子機序としては、ステロイド性抗炎症薬と GR の複合体が AP-1 と直接結合し、AP-1 の DNA 結合を抑制することが有力視されている (3-5)。本研究では、dexamethasone は JNK の活性化を抑制することにより、AP-1 の活性化を抑制することを初めて明らかにし、ステロイド性抗炎症薬の AP-1 活性抑制作用の新しい機序を提唱した (8)。

AP-1 の転写活性の発現には、その構成分子である c-Jun が JNK によりリン酸化されることが重要である (9)。IgE で感作された RBL-2H3 細胞を抗原刺激すると、JNK の活性化と c-Jun のリン酸化が生じることが確認された (Fig. 1)。Dexamethasone で 18 時間前処理することにより、この抗原刺激による JNK の活性化が強く抑制されることが明らかになった (Fig. 2)。このとき c-Jun のリン酸化も抑制されたこと (Fig. 2) から、ステロイド性抗炎症薬による JNK の活性化抑制作用が AP-1 の転写活性抑制のひとつの機序であることが示唆された。

RBL-2H3 細胞における抗原刺激による JNK の活性化は、PI3-kinase の活性化により Vav が活性化され、これが低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化を引き起こす (10,11) ことにより、MEKK-1 の活性化が誘導されると考えられている。実際、Fig. 8 に示すように、PI3-kinase の阻害薬は JNK の活性化を抑制した。私たちは、RBL-2H3 細胞を抗原で刺激すると、チロシンキナーゼ Lyn および Syk が活性化され、Vav のチロシンリン酸化が増大すること (12)、さらに dexamethasone は Vav のチロシンリン酸化を抑制しないこと (2) を明らかにしている。一方今回、Vav の下流であり、JNK キナーゼキナーゼである MEKK-1 の活性化が抑制されることが明らかになった (Fig. 4)。これら

の結果は後に示すように、dexamethasone の ERK 活性化抑制の作用点が ERK キナーゼキナーゼである Raf-1 にあることと一致し、ステロイド性抗炎症薬の MAP キナーゼ活性化抑制作用点は MAPKキナーゼキナーゼレベルにあることが想定された。

AP-1 は、単に AP-1 依存的な遺伝子発現に関与しているだけでなく、種々のサイトカインの産生において転写因子 NF-AT の作用を増強することも知られている。そのひとつの例として IL-4 がある (13) ので、つぎに RBL-2H3 細胞において、AP-1 の活性化抑制が、IL-4 産生抑制につながるかどうか解析した。

4-2 MAP kinase 活性化抑制薬の IL-4 産生抑制作用

MAP キナーゼは AP-1 をはじめとする種々の転写因子の活性化に関与している。肥満細胞は IL-4 (14)、IL-6 (15) および TNF- α (16) など種々のサイトカインを産生する。これらの中で、転写制御機構の解析が進んでおり、しかも AP-1 の関与が明らかにされている IL-4 産生について注目した。すなわち、MAP キナーゼの活性化あるいは活性を抑制する薬物が、抗原刺激による RBL-2H3 細胞からの IL-4 の産生を抑制するかどうか検討した。PI3-kinase 阻害薬は抗原刺激による ERK の活性化はほとんど抑制しない (Fig. 6) もの、JNK および p38 MAPK の活性化を強く抑制した (Figs. 7 および 8)。JNK の活性化を特異的に抑制する薬物はこれまで報告されていないため、wortmannin の作用を検討し、ERK 活性化阻害薬 PD98059 および p38 MAPK の活性阻害薬 SB203580 の効果と比較した。その結果、wortmannin および SB203580 は IL-4 産生および IL-4 mRNA の増加を濃度依存的に抑制し (Figs. 9 および 12)、PD98059 はむしろ増加させた (Fig. 11)。したがって、RBL-2H3 細胞からの IL-4 産生は少なくとも JNK および p38 MAPK の活性化を抑制することにより抑制されることが明らかになった。なお、wortmannin は多様な作用を持つが、他の PI3-kinase 阻害薬 LY294002 も同様の IL-4 産生抑制作用を示した (Fig. 10) ことから、wortmannin の IL-4 産生抑制作用は PI3-kinase を抑制した結果であると考えられる。また、TNF- α の産生は PD98059 で抑制されることも報告されており (17)、MAP キナーゼの活性化あるいは活性を抑制することは多くのサイトカインあるいは炎症性蛋白質の発現を抑制

することにつながることを示唆された。PI3-kinase は肥満細胞の脱顆粒反応 (15,18-20) や vesicle transport (21) を抑制すること、また TNF- α の産生を抑制すること (22) が報告されているが、本研究により、IL-4 の産生にも関与していることが明らかになり、PI3-kinase の阻害薬が強い抗炎症・抗アレルギー作用を発現する可能性も考えられる。

JNK は c-Jun をリン酸化し、AP-1 の活性化を引き起こすが、p38 MAPK がどのように IL-4 産生に寄与するかは不明である。p38 MAPK は転写因子 ATF-2 をリン酸化し、その転写活性を増大させるが、ATF-2 が結合する DNA 配列 cAMP responsive element (CRE) は IL-4 の上流には見出されていない (23-25)。p38 MAPK はまた、転写因子 myocyte-enhancer factor 2C をリン酸化し、c-Jun の発現を誘導することも知られている (26)。RBL-2H3 細胞において抗原刺激により c-Fos および c-Jun の mRNA の発現が増大することも報告されており (27)、p38 MAPK は AP-1 の構成因子の発現調節に寄与している可能性もある。

本研究ではまた、PD98059 が IL-4 産生を増大させることも明らかになった。ERK は MAPK phosphatase である MKP-3 を誘導する作用があるため (28)、ERK の活性化を抑制すると p38 MAPK の活性化が生じることも明らかにされている (29)。また PD98059 は TNF- α のプロモーター領域による遺伝子発現を増大することも報告されており (22)、ERK あるいは PD98059 は MAP kinase の活性化制御以外の未知の作用も持っている可能性がある。

4-3 レチノイドの IL-4 産生抑制作用

レチノイドはレチノイン酸受容体 RAR あるいはレチノイン酸 X 受容体に結合し、特異的蛋白質の産生を誘導する。一方、分化促進、増殖抑制作用などがあり、白血病などの治療にも応用されている。また、その分子機序として AP-1 の転写活性の抑制作用が明らかにされている。本研究では、IL-4 産生に AP-1 がどの程度関与しているかを明らかにするために、レチノイドとして RAR や RAX との親和性が明らかにされている diazepinylbenzoic acid 誘導体を用いて、レチノイドの IL-4 産生に対する作用を検

討した。RAR 選択的レチノイドである Re80 および Am80 は抗原刺激による IL-4 の産生 (Fig. 13) および IL-4 mRNA の増加 (Fig. 14) を抑制したことから、レチノイドは mRNA レベルで作用していると考えられる。Re80 および Am80 の作用は、RAR 拮抗薬である LE540 で打ち消され (Fig. 15)、RXR 選択的レチノイドである HX600 で増強された (Fig. 16) ことから、レチノイドの IL-4 産生抑制作用は RAR を介したものであると考えられる。これまで、3 種の RAR (α , β および γ) が知られている (30)。Re80 はすべてのタイプの RAR に結合するが、Am80 は RAR α に強く、RAR β に弱く結合する (31) ことから考えて、IL-4 産生抑制作用は主として RAR α を介したものであると言える。

前述の AP-1 の活性化を抑制する PI3-kinase 阻害薬が IL-4 産生を部分的に抑制した結果と一致して、AP-1 の活性を抑制する作用を持つレチノイドもほぼ 40 % 弱の抑制作用しか示さなかった。IL-4 の転写には、主として NF-AT と AP-1 が関与しており (13)、両方が IL-4 のプロモーター領域の特定領域に結合することが最大の転写を誘導するのに必要である。とくにレポーター遺伝子を用いた解析から、NF-AT の結合が重要で、AP-1 が結合することにより NF-AT による転写が増大することが明らかにされている (13)。本研究において、NF-AT の活性化を抑制する cyclosporin A が抗原刺激による IL-4 産生を強く抑制したこと (Fig. 17) から、RBL-2H3 細胞においても NF-AT の関与が大きく、AP-1 は増強的に作用していると考えられる。

レチノイドはこれまで、IL-6 の産生を抑制することが報告されており (32,33)、白血病細胞の増殖だけでなく、免疫系に対する作用も注目されていた。また、最近レチノイドは CD40+IL-4 で刺激された B 細胞からの IgE 産生を抑制することが報告されている (34) が、今回さらに IgE 産生に重要な役割を果たす IL-4 の産生も抑制することが明らかになり、レチノイドは IgE の産生を制御し、アレルギー性炎症の発症と増悪を抑制する薬物として有用である可能性が示唆された。

4-4 ステロイド性抗炎症薬の MAP kinase 活性化抑制作用機序

Dexamethasone は、RBL-2H3 細胞において、抗原刺激による ERK の活性化を抑制する(2) だけでなく、上述のように JNK の活性化も抑制する。グルココルチコイド受容体拮抗薬 ERK の活性化抑制作用を打ち消したことから、この MAP キナーゼ活性化抑制作用は GR を介したものであることが明らかになった(データ未掲載)。また、ERK の活性化抑制作用は Raf-1 であることをすでに明らかにしている(2) が今回、JNK の活性化抑制作用も MEKK-1 の活性化抑制であることを明らかにし、ステロイド性抗炎症薬の作用点は MAPK キナーゼキナーゼレベルであることが示唆された。本研究ではさらに、dexamethasone がどのような分子機序で Raf-1 の活性化を抑制するか解析した。抗原刺激により、IgE が架橋されるとチロシンキナーゼが活性化し、ついで低分子量 G 蛋白質 Ras が活性化される。Raf-1 は活性型 Ras と結合することにより細胞膜に移行し、そこでリン酸化を受けて活性化する(35-37)。Dexamethasone は抗原刺激によるチロシンキナーゼの活性化を抑制せずに、Raf-1 のリン酸化を低下させることをすでに明らかにしている(2) ので、本研究では、dexamethasone が Raf-1 の膜移行を抑制しているのか、あるいはリン酸化を直接抑制しているのかを明らかにすることを目的とし、Raf-1 の膜移行について検討した。その結果、dexamethasone は抗原刺激による Raf-1 の細胞質から細胞膜画分への移行は抑制しないことが明らかになり (Fig. 18)、dexamethasone の Raf-1 の活性化抑制作用は、膜画分へ移行した後の Raf-1 のリン酸化反応を抑制しているか、あるいは Raf-1 の脱リン酸化を亢進していることが示唆された。

ERK や JNK の活性化抑制作用には、比較的長時間の前処理が必要であることから、この Raf-1 リン酸化反応の抑制は、リン酸化酵素の転写阻害による蛋白質量の低下、なんらかの阻害蛋白質の誘導、あるいは脱リン酸化酵素の誘導などが考えられ、今後さらに詳細な検討が必要である。この分子機序の解析のために、現在、種々の Raf-1 の部分ペプチドの GST 融合蛋白質を作成し、Raf-1 リン酸化酵素を探索している。

5. 結論と今後の展望

本研究ではステロイド性抗炎症薬のサイトカイン産生機序のひとつとして、MAP キナーゼの活性化抑制を明らかにした。また、MAP キナーゼの活性化を抑制する薬物がサイトカインの産生を抑制することも明らかにし、MAP キナーゼの活性調節が、新規抗炎症薬の開発の標的となりうることが示唆された。今後、MAP キナーゼの活性化を抑制する薬物が抗炎症・抗アレルギー薬として開発されることが期待される。

また、ステロイド性抗炎症薬の作用機序として GR との複合体が転写因子の活性を直接抑制するだけでなく、細胞内情報伝達経路を抑制することも見出し、その一端の分子機序を明らかにした。一方、ステロイド性抗炎症薬の IL-4 産生抑制作用は AP-1 の活性・活性化抑制作用を示す薬物に比べて強力であり、NF-AT の活性・活性化に対する作用など、さらにステロイド性抗炎症薬の作用点を解析することの必要性も示唆された。

文 献

1. Barnes, P.J., Pedersen, S. and Busse, W.W. (1998) Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 157,S1-S53.
2. Rider, L.G., Hirasawa, N., Santini, F. and Beaven, M.A. (1996) Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is suppressed by low concentrations of dexamethasone in mast cells. *J. Immunol.* 157,2374-2380.
3. Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62,1189-1204.
4. Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62,1205-1215.
5. Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62,1217-1226.
6. Chen, D., Waters, S.B., Holt, K.H. and Pessin, J.E. (1996) SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 271,6328-6332.
7. Edamatsu, T., Xiao, Y.-Q., Tanabe, J., Mue, S. and Ohuchi, K. (1997) Induction of neutrophil chemotactic factor production by staurosporine in rat peritoneal neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 121,1651-1658.
8. Hirasawa, N., Sato, Y., Fujita, Y., Mue, S. and Ohuchi, K. (1998) Inhibition by dexamethasone of antigen-induced c-Jun N-terminal kinase activation in rat basophilic leukemia cells. *J. Immunol.* 161,4939-4943.
9. Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J.R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353,670-674.
10. Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. and Bustelo, X.R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385,169-172.
11. Teramoto, H., Salem, P., Robbin, K.C., Bustelo, X.R. and Gutkind, J.S. (1997) Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcεRI to the rac1-JNK pathway. *J. Biol. Chem.* 272,10751-10755.
12. Hirasawa, N., Scharenberg, A., Yamamura, H., Beaven, M.A. and Kinet, J.-P.

- (1995) A requirement for syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A₂ pathway by FcεRI is not shared by a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 270,10960-10967.
13. Rooney, J.W., Hoey, T. and Glimcher, L.H. (1995) Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* 2,473-483.
 14. Marone, G., Casolaro, V., Patella, V., Florio, G. and Triggiani, M. (1997) Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114,207-217.
 15. Marquardt, D.L., Alongi, J.L. and Walker, L.L. (1996) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin blocks mast cell exocytosis but not IL-6 production. *J. Immunol.* 156,1942-1945.
 16. Baumgartner, R.A., Yamada, K., Deramo, V.A. and Beaven, M.A. (1994) Secretion of TNF from a rat mast cell line is a brefeldin A-sensitive and a calcium/protein kinase C-regulated process. *J. Immunol.* 153,2609-2617.
 17. Zhang, C., Baumgartner, R.A., Yamada, K. and Beaven, M.A. (1997) Mitogen-activated protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor-α and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 272,13397-13402.
 18. Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. and Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268,25846-25856.
 19. Ozawa, K., Masujima, T., Ikeda, K., Kodama, Y. and Nonomura, Y. (1996) Different pathway of inhibitory effects of wortmannin on exocytosis are revealed by video-enhanced light microscope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222,243-248.
 20. Hirasawa, N., Sato, Y., Yomogida, S., Mue, S. and Ohuchi, K. (1997) Role of phosphatidylinositol 3-kinase in degranulation induced by IgE-dependent and -independent mechanisms in rat basophilic RBL-2H3 (m1) cells. *Cell. Signal.* 9,305-310.
 21. Jones, S.M. and Howell, K.E. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the formation of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell. Biol.* 139,339-349.
 22. Ishizuka, T., Terada, N., Gerwins, P., Hamelmann, E., Oshiba, A., Fanger, G.R., Johnson, G.L. and Gelfand, E.W. (1997) Mast cell tumor necrosis

- factor α production is regulated by MEK kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,6358-6363.
23. Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C., Davydov, I.V. and Krammer, P.H. (1997) Differential interaction of nuclear factors with the PRE-1 enhanced element of the human IL-4 promoter in different T cell subsets. *J. Immunol.* 158,1194-1200.
 24. Davydov, I.V., Krammer, P.H. and Li-Weber, M. (1995) Nuclear factor-IL-6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J. Immunol.* 155,5273-5279.
 25. Ho, I.-C., Hodge, M.R., Rooney, J.W. and Glimcher, L.H. (1997) The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85,973-983.
 26. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V. and Ulevitch, R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386,296-299.
 27. Razin, E., Szallasi, Z., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M. and Rivera, J. (1994) Protein kinases C- β and C- ϵ link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,7722-7726.
 28. Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. and Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280,1262-1265.
 29. Berra, E., Diaz-Meco, M.T.D. and Moscat, J. (1998) The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 273,10792-10797.
 30. Glass, C.K., DiRenzo, J., Kurokawa, R. and Han, Z.H. (1991) Regulation of gene expression by retinoic acid receptors. *DNA Cell Biol.* 10,623-638.
 31. Umemiya, H., Fukasawa, H., Ebisawa, M., Eyrolles, L., Kawachi, E., Eisenmann, G., Gronemeyer, H., Hashimoto, Y., Shudo, K. and Kagechika, H. (1997) Regulation of retinoid actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers. *J. Med. Chem.* 40,4222-4234.
 32. Zitnik, R.J., Kotloff, R.M., Latifpour, J., Zheng, T., Whiting, N.L., Schwalb, J. and Elias, J.A. (1994) Retinoic acid inhibition of IL-1-induced IL-6 production by human lung fibroblasts. *J. Immunol.* 152,1419-1427.
 33. Kagechika, H., Kawachi, E., Fukasawa, H., Saito, G., Iwanami, N., Umemiya, H., Hashimoto, Y. and Shudo, K. (1997) Inhibition of IL-1-induced IL-6

production by synthetic retinoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231,243-248.

34. Worm, M., Krah, J.M., Manz, R.A. and Henz, B.M. (1998) Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE⁺ production in vitro. *Blood* 92,1713-1720.
35. Leever, S.J., Paterson, H.F. and Marshall, C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369,411-414.
36. Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M. and Hancock, J.F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264,1463-1467.
37. Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., Macdonald, S., King, A. and Marshall, M. (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for ras-dependent activation and biological signaling. *Mol. Cell. Biol.* 17,4509-4516.

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。